

氏 名	馬 場 一 信
学 位 の 専 攻 分 野 の 名 称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	甲理第151号 (文部科学省への報告番号甲第499号)
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	2014年2月19日
学 位 論 文 題 目	Siah2, which causes a small-eye phenotype by degradation of PHD, regulates the level of Nrf2 escaped from Keap1
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松 田 祐 介 (副査) 教 授 今 岡 進 専任講師 関 由 行

酸素濃度の変化は生体に重篤な影響を与える。病態においてはがんや血管の梗塞において酸素供給が低下する状態、生理的には発生過程において、やはり低酸素状態（酸素濃度が低下する状態）が重要な働きをしていると考えられている。生体が低酸素に陥るとそれに対する応答反応が起こる。低酸素応答における鍵因子は、低酸素応答因子 HIF であり、HIF の発現量を調節するためのいわゆる低酸素応答系因子が存在する。細胞が急激に増殖するがんや発生過程においては、細胞が低酸素状態になっており、低酸素応答系が重要な働きをしていると考えられており、がん治療や発生機構の解明のための低酸素応答系の研究が進められている。一方、生体からの臓器摘出や心筋梗塞などにおいては、一時的血流の遮断によって酸素濃度が低下するが移植や治療によって、血流が再開し再び酸素が供給される。この状態を虚血・再灌流と呼ぶ。低酸素から血流が再開されると急激な酸素濃度上昇が起こるため、酸化ストレスが発生しこれを虚血・再灌流障害という。この論文では、発生過程において目の形成が阻害される小眼症 (small-eye) を引き起こす原因遺伝子として発見された Siah2 が小眼症を引き起こすメカニズムを解明した。さらに Siah2 が、酸化ストレス応答に関わることを発見し、上記の虚血・再灌流障害を軽減できる治療の糸口を見いだした。

論 文 内 容 の 要 旨

この論文は2章から成る。それぞれ、Siah2の生理機能についての研究であるが第1章ではアフリカツメガエルを用いた *in vivo* での検討、第2章は培養ヒト細胞を用いた *in vitro* での検討である。第1章では Siah2 が発見された由来である小眼症 (small-eye) の発症メカニズムをアフリカツメガエルで検討した。1990年に黄色ショウジョウバエの小眼症を伴った変異体の遺伝子解析を行ったところ、ある遺伝子の変異が小眼症の原因であることがわかり、この遺伝子は、seven in absentia (sina) と名付けられた。その後、Sina のホモログとしてマウスにおいて Seven in absentia homolog (Siah) が同定された。さらに Siah には、ヒトやマウスにおいて2種類のホモログ Siah1 及び Siah2 が存在し、この二つの遺伝子はよく似た働きであることが明らかとなった。その後、この遺伝子についてはめざましい発見はなかったが2004年に低酸素応答等に関わっていることが発見され、注目を集めた。すなわち、低酸素によって活性化された Siah2 は HIF の調節因子である PHD を分解し、HIF を増やし、これが低酸素応答を促進していることが明らかとなった。今岡研究室の先行研究においてアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の sina (Siah2) ホモログが単離され xSiah2 と命名された。アフリカツメガエル卵に Siah2 mRNA を導入すると小眼症が引き起こされ、アフリ

カツメガエルにおいても Siah2 がショウジョウバエと同様の機能を持っていることを証明した。本研究ではこのメカニズムについて詳しい検討を加えた。まず、WISH 法によって xSiah2 がアフリカツメガエルの発生過程において、いつどこに発現するのかを検討した。その結果、レンズ胞及びレンズプラコード形成期において、目の周囲に発現することが明らかとなった。次に Siah2 を過剰発現させたところ、レンズプラコード形成期に PHD が減少しそれに伴って低酸素感受性因子 HIF の増大がみられた。一方で、この時期に HIF の阻害剤レスベラトロールを添加すると、目の異常が回復し、小眼症は HIF の量の変化によって引き起こされていることが証明された。発見以来明らかでなかった Siah2 が小眼症を引き起こす原因が HIF の量の変化であることが明らかとなり、HIF が上皮間葉転換に関わる可能性も示唆された。

第2章においては Siah2 の新しい生理機能を発見した成果を述べている。今岡研究室の先行研究において、低酸素状態において酸化ストレス応答の鍵因子である Nrf2 が低下することを明らかにしていた。Nrf2 は酸化ストレスによって安定化誘導され、さまざまな抗酸化因子を発現して酸化ストレスから生体を守る。これは先に述べた虚血・再灌流障害においては極めて重要なことであり、低酸素状態における Nrf2 低下は、次に起こる酸化ストレス応答に大きな影響を及ぼすので Nrf2 の低酸素による低下のメカニズムを検討した。まず、Nrf2 が低酸素状態において低下するのはプロテアゾーム依存性であることを確認した。それまで Nrf2 は Keap1 が結合することで、ユビキチン化されプロテアゾームで分解されと考えられていた。酸化ストレスにおいて活性酸素や活性ラジカルが発生すると Keap1 に結合しその構造を変化させて、Nrf2 との結合を阻止することで Nrf2 が安定化し働く。さらに酸化ストレスは細胞のリン酸化活性を促進するが、Nrf2 のリン酸化は Keap1 からの放出を促す。そこでまず、低酸素状態で Keap1 が活性化されることで、Nrf2 が低下しているかどうか検討した。Keap1 との結合部位を除去した Nrf2 の変異体を作成し、低酸素状態でその量を調べたところ、非変異体と同様に低酸素状態で低下した。この結果から、低酸素で活性化される新規のユビキチンリガーゼが Nrf2 を分解している可能性が示唆された。先に述べたように Siah2 は低酸素によって活性化されるユビキチンリガーゼである。そこで Nrf2 上に Siah2 との結合配列を検索したところ、AXVXP のコンセンサス配列の存在が確認された。まず、Siah2 をノックダウンまたは阻害剤であるメナジオンを添加すると低酸素による Nrf2 の低下が抑制された。Siah2 との結合部位に変異を導入すると Nrf2 の低酸素での低下は抑制された。さらに、Nrf2 と Siah2 の直接的な相互作用も変異の導入によって消失することが、免疫沈降法によって証明された。一方、Nrf2 において40番目のセリンをアスパラギンに置換したリン酸化を受けない変異体を作成したところ Keap1 ノックダウンで顕著な増加が見られ、セリンをアスパラギンに置換した擬似リン酸化体では低酸素状態での Siah2 ノックダウンにおいて、顕著な増加が見られた。さらに、Siah2 のノックダウンにおいて Nrf2 のユビキチン化状態は低下した。この結果から Nrf2 がリン酸化されることで Keap1 から離れ分解を免れて安定化し、様々な抗酸化因子を誘導することが明らかとなった。以上の成果をまとめると、これまで Nrf2 の発現量調節をしているのは Keap1 のみと考えられていたが、この研究によって Nrf2 の新たな調節因子としてユビキチンリガーゼ Siah2 が明らかにされ、さらにこの因子は Nrf2 が Keap1 を離れ働いた後の量を調節している因子であることが明らかとなった。一方で、低酸素状態において Nrf2 が減少するメカニズムも明らかになったことから虚血・再灌流障害軽減への道が開ける研究でもある。

論文審査結果の要旨

本学位論文では Siah2 という新規ユビキチンリガーゼの機能について、アフリカツメガエルを用いた発生の実験及び培養ヒト細胞を用いて明らかにした。まず、最初に黄色ショウジョウバエで小眼症 (Small-eye) を引き起こす遺伝子 Sina (脊椎動物では Siah2) として発見されたが、この研究では Siah2 が低酸素応答系因子 HIF を介して、小眼症を引き起こしているメカニズムを解明した。ヒトにおいても Siah2 遺伝子の変

異は先天的な目の異常を引き起こすことが明らかになっており、一方で、最近、食物に含まれ、抗動脈硬化、抗がん作用のある物質として注目されているレスベラトロールがアフリカツメガエルの小眼症を回復させることは興味深い。この研究成果はヨーロッパ生化学分子生物学会誌の web 版ジャーナル FEBS Open Bio に報告している。一方、培養ヒト細胞を用いた検討では、虚血・再灌流モデルを用いた検討から、低酸素において、酸化ストレス応答の鍵因子である Nrf2 が低下する現象のメカニズム解明から、Nrf2 の新しい調節因子として Siah2 を同定した。これまで Nrf2 の調節因子として Keap1 のみが明らかにされているが、この研究は酸化ストレス応答のメカニズムについて新たな因子を加えることになる。また、虚血・再灌流障害は血管梗塞、臓器移植など現在の医療においても大きな問題であり、この研究はこの分野の医療問題を解決するための糸口となり得る。この研究成果は米国生化学会分子生物学会誌 Journal of Biological Chemistry に報告した。この論文はこのジャーナルに年間約6600報が採択された中で、優秀な論文上位 1 ～ 2 % が選ばれる The paper of the week に採択され、高い評価を得た。審査委員は本論文の内容を中心に面接と公開の論文発表会を行い、著者が論文内容や用いた技法について十分な理解とともに関連する分野についても学識を有し、また将来の研究遂行に対しても十分な能力を持つことを確認した。以上のことより、審査委員会は本論文の著者が博士（理学）の学位を授与されるに足る十分な資格を有するものと判定する。